

論文内容の要旨

申請者氏名 西尾 美紀

哺乳類の DNA メチル化は DNA メチル化酵素によって引き起こされ、メチル化 DNA 結合タンパク質 (MBP) などが遺伝子の発現調節を介して細胞の増殖と分化、細胞死を制御している。DNA メチル化酵素のノックアウト (KO) マウスは胎生 9.5 日目 (E9.5) に致死となることが示されたため、MBP も初期胚発生に必要であることが示唆された。しかし、既知の MBP をコードする遺伝子群の KO マウスが初期胚発生に異常を示す報告が存在しなかったため、この時期における MBP の重要性は未解明のままであった。先行研究により、新規 MBP であるジンクフィンガー型の転写因子 CIBZ は、ES 細胞などでは細胞増殖を促進し、細胞死を抑制することが示されており、CIBZ のヘテロ欠損マウスは胎生致死である可能性が示唆された。本研究では、Cre-loxP システムを用いて、CIBZ のヘテロ欠損 ($\Delta fl/+$) マウスを作製し、CIBZ のヘテロ欠損によって異常が引き起こされる時期を明らかにした上で、その詳細なプロセスを解明することを目的とする。

まず、CIBZ の $fl/+$ マウスを樹立し、この $fl/+$ マウスと Cre を全身で発現するマウスとの交配により $\Delta fl/+$ マウスの作製を行い、その解析を行った。その結果、出生したマウスの中には $\Delta fl/+$ という遺伝型のマウスが確認されなかった。次に、 $\Delta fl/+$ 胎仔の発生状態を追跡するために、E6.5 からの胎仔の遺伝型の同定と形態解析を行った。その結果、 $\Delta fl/+$ 胎仔は野生型と比較して、E6.5 で縮小し始め、E7.5~E8.5 では縮小がさらに進行して、E9.5 で死に至ることが示された。以上の結果より、CIBZ のヘテロ欠損胎仔は E6.5 より早期に異常が始まること、E9.5 で胎生致死を示すことが明らかにされた。

CIBZ のヘテロ欠損が 2 細胞期胚から胚盤胞 (E3.5) までの発生に影響する可能性を検証するため、2 細胞期胚から胚盤胞までの培養を行い、遺伝型や形態、免疫組織染色による解析を行った。その結果、胚盤胞までの各時期では、 $\Delta fl/+$ 胚は野生型と類似な形態を示し、細胞死マーカーである caspase-3 の活性に変化がなかった。CIBZ のヘテロ欠損が胚盤胞以降の発生に影響を与える可能性を調べるため、胚盤胞の培養による解析を行った。その結果、培養 4 日目の胚盤胞では、CIBZ の $\Delta fl/+$ 胚は野生型と比較して、胎仔個体の形成に寄与する内部細胞塊 (ICM) 由来の部分の有意な縮小と caspase-3 の活性上昇を示したが、胎盤の形成に寄与する栄養膜由来の部分に関しては、その大きさと caspase-3 の活性には異常は観察されなかった。これらのことから、CIBZ の発現は胚盤胞までの胚発生には必要ないが、胚盤胞の ICM の発生に重要であることが示唆された。最後に、CIBZ のヘテロ欠損が ICM の発生にどう影響するかを調べるため、CIBZ ヘテロ欠損胚盤胞の ICM から ES 細胞株を樹立し、その解析を行った。その結果、 $\Delta fl/+$ の ES 細胞では、野生型と比較して、CIBZ の発現 (mRNA とタンパク質) が約 1/2 に低下し、未分化性を規定する一部のマーカー遺伝子の発現の減少によって分化傾向の増大が見られたが、基本的には、細胞の未分化性が維持されていることが明らかとなった。

やむを得ない事由 [図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 西尾 美紀

哺乳類では、DNA メチル化は遺伝子の発現制御を介して細胞の増殖や分化、細胞死などの運命決定に重要な役割を果たすことが知られている。DNA メチル化機構の柱であるメチル化酵素が初期胚の発生に必須であることが示されている一方で、もう一つの柱であるメチル化 DNA 結合タンパク質 (MBP) をコードする遺伝子群の KO マウスのこれまでの解析では初期胚の発生に異常が示されなかったため、胚発生における MBP の重要性は明らかにされていない。

申請者所属の研究室では、新規 MBP であるジンクフィンガー型の転写因子 CIBZ が同定された。ES 細胞などでは、CIBZ の発現低下による増殖阻害と細胞死の亢進が報告されており、CIBZ のヘテロ欠損マウスは胎生致死である可能性が示唆された。申請者は、胎生致死を回避できる Cre-loxP システムを用いて、CIBZ のヘテロ欠損 ($\Delta fl/+$) マウスの作製と解析を行った。その結果、野生型の胎仔と比較して、 $\Delta fl/+$ 胎仔が E6.5 から縮小し始め、E7.5~E8.5 では縮小が進行して、E9.5 で死に至ることを明らかにした。2細胞期胚からの胚発生を模倣する培養実験では、CIBZ のヘテロ欠損胚は、胚盤胞に達するまでに形態異常と細胞死の亢進を示さなかった。一方で、着床時期の胚発生を模倣する胚盤胞の培養実験では、CIBZ のヘテロ欠損胚は胎仔個体の形成に寄与する内部細胞塊 (ICM) 由来の部分に有意な縮小と細胞死の亢進を示したが、胎盤の形成に寄与する栄養膜由来の部分には、その大きさや細胞死の割合に関する異常は観察されなかった。さらに、胚盤胞の ICM から樹立した $\Delta fl/+$ の ES 細胞では、ES 細胞の特徴である未分化性が維持されているものの、野生型と比較して分化しやすい傾向を示すこと、CIBZ の mRNA とタンパク質の発現が約 1/2 に低下すること、などが明らかになった。以上のことから、胚盤胞発生の進行に伴い、CIBZ のヘテロ欠損による ICM の細胞死亢進などが原因で、胎仔の発生に異常をきたす可能性が示された。

以上のように、本論文は、メチル化 DNA 結合タンパク質の中で CIBZ がマウス初期胚の発生に必要であること、CIBZ 遺伝子のコピー数が重要であること、を初めて明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】